Untersuchungen über die Speicherung und Freisetzung von Histamin bei Thrombocyten

Bärbl Zitzelsberger

1965

AUS DER KLINISCH-CHEMISCHEN ABTEILUNG DER CHIRURGISCHEN KLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Untersuchungen über die Speicherung und Freisetzung von Histamin bei Thrombocyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bärbl Zitzelsberger
aus Zeitz

München 1965

A. Schubert, München 5, Corneliusstraße 21 · Telefon 221777

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof. Dr. Dr. E. WERLE
Dekan: Prof. Dr. O. HUG

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 6. 1965



Herrn Prof. Dr. Dr. E. WERLE möchte ich für die Überlassung des Themas der Arbeit danken.
Herrn Priv.-Doz. Dr. H. SCHIEVELBEIN möchte ich für die Anregungen und Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Untersuchungen danken.
Frl. V. SCHIRREN möchte ich für die Anleitung bei den experimentellen Untersuchungen danken.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555228_0018

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG 7

PROBLEMSTELLUNG 9

METHODEN 9

1. Thrombocytengewinnung aus Kaninchenblut 9

2. Histamin-Bestimmung 10

3. Protein-Bestimmung 11

4. Direkte Thrombocytenzählung nach Feissly-Lüdin 12

5. Erythrocytenzählung 12

6. Eingesetzte Substanzen 12

ERGEBNISSE 13

1. Histamin-Freisetzung aus Thrombocyten in vitro 13
   a) Spontanfreisetzung 13
   b) Histamin-Freisetzung und Nikotinkonzentration 13
   c) Histamin-Freisetzung und Wasserstoffionenkonzentration 14
   d) Histamin-Freisetzung und Inkubationstemperatur 15
   e) Histamin-Freisetzung in N_2-Atmosphäre 15
   f) Histamin-Freisetzung durch verschiedene Liberatoren 15
   g) Histamin-Freisetzung und Enzyminhibitoren 17
   h) Einfluss des Plasmas auf die Histamin-Freisetzung 20

2. Histamin-Freisetzung in vivo 20

3. Histamin-Freisetzung aus dem isolierten Darm 21

4. Histamin-Aufnahme durch Thrombocyten in vitro 21
   a) Aufnahme von Histamin durch normale Thrombocyten 21
   b) Aufnahme von Histamin durch entspeicherte Thrombocyten 22
   c) Einfluss von Nikotin auf die Aufnahme von Histamin 23
   d) Einfluss von 48/80 auf die Aufnahme von Histamin 23
   e) Einfluss von Marsilid auf die Aufnahme von Histamin 24

5. Histamin-Verteilungsbilanz im Kaninchenblut 24

DISKUSSION 25

1. Funktion der Thrombocyten 25

2. Aufnahme und Freisetzung von Histamin 26

3. Vergleich zwischen Speicherung und Freisetzung von Histamin und 5-Hydroxytryptamin 29

ZUSAMMENFASSUNG 30

LITERATURVERZEICHNIS 31

EINLEITUNG

Die biogenen Amine, wie z.B. Noradrenalin und Adrenalin, 5-Hydroxytryptamin, und Histamin (Hi), kommen in vielen tierischen Geweben vor, wobei ihre Verteilung in diesen nicht gleichmässig ist.
Während die physiologische Bedeutung des Noradrenalins als Überträgersubstanz der Erregungen des sympathischen Nervensystems seit längerer Zeit bekannt ist, sind die physiologischen Funktionen der anderen biogenen Amine nicht geklärt. Die biogenen Amine liegen in ihren Depots in einer pharmakologisch unwirksamen Form vor, d.h. sie entfalten an diesen Orten nicht ihre charakteristischen Wirkungen. Diese treten erst dann in Erscheinung, wenn das Bindungsvermögen der sie speichernden Organellen oder Zellen durch innere oder äussere Einflüsse aufgehoben wird.
Es ist bekannt, dass eine Reihe von Pharmaka ihre Wirkung durch die Fähigkeit, biogene Amine aus ihren Speicherungsorten freizusetzen, ausübt.
Im Hinblick auf die Kenntnis der physiologischen Funktionen der biogenen Amine ist die Frage von Bedeutung, ob Speicherung und Freisetzung aller biogenen Amine den gleichen Gesetzmässigkeiten unterworfen sind. Untersuchungen über die Freisetzung von biogenen Aminen liegen in grosser Zahl vor, doch sind vergleichende Untersuchungen relativ selten durchgeführt worden, da sie ein Modell erfordern, in welchem möglichst viele der zu untersuchenden Amine vorkommen.
Bekannt ist, dass Nikotin Adrenalin und Noradrenalin aus dem Nebennierenmark freizusetzen vermag. SCHIEVELBEIN und WERLE (1) wiesen nach, dass Nikotin weiterhin 5-Hydroxytryptamin und Hi freisetzen kann. Während der Freisetzungsmechanismus von 5-Hydroxytryptamin durch Nikotin eingehend untersucht wurde, liegen über die Freisetzung von Hi durch Nikotin bisher nur orientierende Arbeiten vor. Es sollte daher die Hi-Entspeicherung tierischer Gewebe durch Nikotin näher untersucht werden, ebenso die Frage, ob gleiche Gesetzmässigkeiten bei der Freisetzung von 5-Hydroxytryptamin und von Hi durch Nikotin bestehen.

Hi besitzt eine erhebliche pharmakologische Aktivität, es kontrahiert glatte Muskeln, wirkt stark blutdrucksenkend, zeigt Einfluss auf die Drüsentätigkeit, z.B. die Salzsäuresekretion im Magen und ist beim Zustandekommen allergischer Reaktionen beteiligt; so wiesen DALE und LAIDLAW (2) bereits 1910 auf einen Zusammenhang zwischen den Wirkungen toxischer Hi-Dosen und den Symptomen des anaphylaktischen Schocks hin. Neuerdings wird dem Hi eine Bedeutung bei der Regulation der normalen Gewebsdurchblutung zugeschrieben (3).

Im menschlichen Organismus findet sich Hi besonders in der glatten Muskulatur, in der Haut, in der Lunge und in der Magenschleimhaut. Im Blut der meisten Tiere ist der Hi-Gehalt gering. Eine vergleichende Übersicht von SHORE (4) lässt erkennen, dass der Hi-Gehalt der gleichen Organe verschiedener Tierarten grössere Schwankungen aufweist; sie zeigt auch, dass Kaninchenblut besonders grosse Mengen Hi enthält. Nach PATON (5) und nach CODE (6) ist das Hi des menschlichen Blutes zum weitaus grössten Teil an die Formelemente gebunden, insbesondere an die polymorphkernigen Leukocyten und an die Plättchen. Es liegt auch hier in einer pharmakologisch inaktiven Form vor.

An Gewebe für vergleichende Freisetzungsversuche werden bestimmte Anforderungen gestellt. Bei Untersuchungen über die Freisetzung von 5-Hydroxytryptamin hatten sich Kaninchenthrombocyten bereits als günstig erwiesen (7). Sie erfüllen auch eine Reihe von Bedingungen, welche für Untersuchungen über die Hi-Freisetzung gegeben sein müssen, so fand HUMPHREY (8), dass sie die ausschliessliche Quelle des Blut-Hi bei Kaninchen darstellen und nach WEISSBACH, BOGDANSKI und UDENFRIED (9) sind die Plättchen in der Lage, Hi in vivo und vitro zu speichern. Nach SCHAYER und KOBAYSHI (10) können isolierte Blutplättchen Hi aus Histidin bilden, da sie eine spezifische Histidindecarboxylase besitzen. Diese Fähigkeit konnte bei den Untersuchungen dieserArbeit vernachlässigt werden, da die eingehaltenen Inkubationszeiten so kurz bemessen waren, dass keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem Gesamt-Hi-Gehalt vor und nach dem Versuch festgestellt werden konnten. Ein Hi abbauendes Enzym ist in Thrombocyten nicht enthalten.

Aus zahlreichen Untersuchungen geht hervor, dass Mastzellen reich an Hi sind. Nach WERLE und SCHAUER (11) ist Hi in den Granula der Mastzellen lokalisiert, wobei die Möglichkeit einer Bindung an das Heparin der Mastzellen diskutiert wird. SCHAUER und EDER (12) führen an, dass die im ATP-Molekül vorhandenen sauren Phosphatgruppen für eine Bindung des Hi in Frage kommen, während HÖGBERG und UVNÄS (13) eine Bindung des Hi an Phospholipide in Betracht ziehen.

Verschiedene Pharmaka verursachen bei Versuchstieren eine charakteristische histaminähnliche pharmakologische Reaktion, z.B. die sogenannte "delayed depressor response" (PATON). Es konnte nachgewiesen werden, dass sie durch Hi-Freisetzung hervorgerufen wird. Substanzen, die Hi in hohem Masse freisetzen können, fasste man zur Gruppe der Hi-Liberatoren zusammen. Eine Übersicht über die grosse Zahl dieser Substanzen, welche sehr verschiedenartige chemische Strukturen besitzen, findet sich bei PATON (5).

PROBLEMSTELLUNG

Es sollte festgestellt werden,
1. ob die Entspeicherung von Hi aus Thrombocyten durch Nikotin den gleichen Gesetzmässigkeiten unterliegt wie diejenige von 5-Hydroxytryptamin.
2. ob der Einfluss des Nikotin auf die Speicherungsfähigkeit der Plättchen für Hi auf dem gleichen Mechanismus beruht wie der Einfluss des Nikotin auf die 5-Hydroxytryptamin-Speicherung,
3. ob sich die Freisetzung von Hi durch bekannte Hi-Liberatoren mit der durch Nikotin vergleichen lässt,
4. ob die Substanzen, welche die Freisetzung von 5-Hydroxytryptamin durch Nikotin hemmen (7) auch die durch Nikotin bewirkte Hi-Freisetzung beeinflussen. Sollte ein Einfluss dieser Hemmsubstanzen zu beobachten sein, so sollte festgestellt werden,
5. ob diese auch die Hi-Entspeicherung in vivo verhindern können.

METHODEN

In vitro-Versuche mit isolierten Kaninchenthrombocyten erfolgten in Ansätzen mit plättchenreichem Plasma und mit in isotonischem Phosphatpuffer von pH 7,3 suspendierten Thrombocyten, denen die Zusätze, gelöst in isotonischer NaCl-Lösung oder isotonischem Phosphatpuffer, zugefügt wurden. Um für alle Ansätze gleiche Versuchsbedingungen zu schaffen, wurden, wenn nichts besonderes angegeben, eine Inkubationsdauer von 60 Min., eine Inkubationstemperatur von 37°C und ein pH-Wert von 7,3 eingehalten. Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug 20 ml. Es bestand jeweils aus 10 ml plättchenreichem Plasma bzw. Thrombocytensuspension, denen die gelösten Zusätze zugegeben wurden.

1. THROMBOCYTENGEWINNUNG AUS KANINCHENBLUT

Die Isolierung der Blutplättchen erfolgte in Anlehnung an die Methode der Thrombocytengewinnung für den Thrombokinase-Bildungstest (N. HENNING, KLINISCHE LABORATORIUMSDIAGNOSTIK, S.171, München und Berlin 1959). Mit Pernocton narkotisierte Kaninchen wurden aus der freigelegten A. carotis mittels eines PVC-Katheters in einen Kunststoffbehälter, der 3,8 %ige Na-citrat-

Lösung enthielt, entblutet. Das Blut wurde in Kunststoffröhrchen bei 700 x g 15 Min. bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert und das überstehende thrombocytenhaltige Plasma von den sedimentierten Blutbestandteilen abgehebert. Enthielt das abgeheberte Plasma noch zahlreiche Leukocyten und Erythrocyten, so wurde es nochmals für 10 Min. zentrifugiert. Das so gewonnene plättchenreiche Plasma wurde für die anschliessenden Versuche verwendet, oder die Thrombocyten wurden aus dem Plasma durch Zentrifugieren bei ca 3000 x g sedimentiert und zu Ansätzen in isotonischem Phosphatpuffer aufgenommen. Die sedimentierten Thrombocyten wurden in physiologischer NaCl-Lösung, die 1/10 Teil 3,8 %ige Na-citrat-Lösung enthielt, aufgeschwemmt und wiederum bei 3000 x g zentrifugiert. Nach Wiederholung dieses Vorganges wurde das Plättchensediment für die Hi-Bestimmung mit 0,1 n HCl behandelt oder für einen anschliessenden Versuch resuspendiert.

2. HI-BESTIMMUNG

a) in Thrombocyten

Das gewaschene Thrombocytensediment wurde in 5 ml 0,1 n HCl aufgenommen, die Lösung nach Lysis der Plättchen mit 0,25 ml 10-12 n Perchlorsäure enteiweisst und 10 Min. im Eisbad stehen gelassen. Nach Abzentrifugieren des Eiweisses bei 3000 x g erfolgte die Bestimmung des Hi-Gehaltes der im Ansatz enthaltenen Thrombocytenmenge nach der Methode von SHORE et al (14) und des Eiweissgehaltes mit dem Biuretreagens.

b) in Vollblut, Plasma und Erythrocyten

Zu 10 ml Vollblut wird 1 ml Citratlösung gegeben.
Zellfreies Plasma wurde durch Abzentrifugieren aller zellulären Blutbestandteile gewonnen. Die Zellfreiheit wurde mikroskopisch kontrolliert.
Eine Erythrocytensuspension wurde erhalten, indem Vollblut 15 Min. bei 700 x g zentrifugiert, die überstehende thrombocyten- und leukocytenhaltige Schicht abgesaugt, die zurückgebliebene Erythrocytenschicht mehrfach in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und anschliessend in NaCl suspendiert wurde. Infolge des sehr hohen Eiweissgehaltes der Ansätze wurden in Abänderung der Methode von SHORE und Mitarbeitern (14) 2,5 ml Erythrocytensuspension, entsprechend 2,5 ml Citratblut und 2,5 ml Plasma durch Addition von 7,0 ml H_2O hämolysiert und der Lösung 0,5 ml 10-12 n Perchlorsäure zugefügt. Die Ansätze wurden für 10 Min. geschüttelt, das Eiweiss abzentrifugiert und das Hi in Doppelbestimmungen nach der fluorometrischen Methode ermittelt.

Fluorometrische Hi-Bestimmung

Die von SHORE et al (14) beschriebene Methode hat gegenüber den früher verwendeten, chemischen und auch gegenüber den biologischen Methoden den Vorzug der grösseren Empfindlichkeit und Spezifität.
Das in 9 Teilen 0,4 n Perchlorsäure homogenisierte Gewebe wird 10 Min. stehen gelassen und anschliessend zentrifugiert. 4 ml der überstehenden Flüssigkeit werden in einen Schüttelzylinder überführt, der 0,5 ml 0,1 n NaOH, 1,5 g kristallines NaCl und 10 ml Butanol enthält. Die Lösung wird 5 Min. geschüttelt, um Hi in das Butanol überzuführen und zentrifugiert. Nach Absaugen der wässrigen Phase wird die organische Phase 1 Min. mit 5 ml salzgesättigter 0,1 n NaOH geschüttelt, wobei etwa noch vorhandenes Histidin entfernt wird und danach zentrifugiert. 8 ml des Butanol werden in ein weiteres Schüttelkölbchen gebracht, das 2,5-4,5 ml 0,1 n HCl und 15 ml n-Heptan enthält; dann wird 1 Min. geschüttelt und zentrifugiert. Nach Absaugen der organischen Phase werden 2 ml der säuren Lösung, die 0,005-0,5 µgHi/ml enthalten soll, mit 0,4 ml 1 n NaOH, 0,1 ml 1 %iger o-Phthalsäuredialdehyd-Lösung und nach 4 Min. mit 0,2 ml 3 n HCl versetzt.
Durch Kondensation mit o-Phthalsäuredialdehyd-Lösung, die in stark alkalischem Milieu stattfindet, wird ein labiles Fluoreszenzprodukt gebildet, das durch Säuerung mit 3 n HCl stabilisiert wird. Die Fluoreszenz dieses Kondensationsproduktes wird bei 450 mµ angeregt und bei 360 mµ am Zeiss-Spektralfluorometer PMQ abgelesen. Nach Extraktion und Waschung ist noch eine Gesamtmenge von 85 % des Hi vorhanden. Zur Korrektur dieser Verschiebungen werden Standards bekannten Hi-Gehaltes hergestellt, die durch den Arbeitsgang geführt werden und deren Verlust an Hi während des Versuches ermittelt wird.

3. PROTEINBESTIMMUNG

Der Eiweissgehalt der Ansätze wurde in folgender Weise bestimmt: 0,1 ml Eiweisssediment, 4,9 ml Aqua dest. und 5,0 ml Biuretreagens wurden gemischt und nach 30 Min. die Extinktion bei 546 mµ gegen eine gleichzeitige aus 5,0 ml Biuretreagens und 5,0 ml Aqua dest. bereitete Blindprobe am Photometer abgelesen. Die gefundenen Werte wurden mit einem Faktor multipliziert, der durch Aufstellen einer Eichkurve des Biuretreagens mit Hilfe verschiedener Labtrollösungen ermittelt wurde. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

4. DIREKTE THROMBOCYTENZÄHLUNG NACH FEISSLY-LÜDIN

Blut bzw. thrombocytenreiches Plasma werden in einer Erythrocytenpipette bis zur Marke 0,5 aufgesaugt und mit einer hypotonischen Kokainlösung oder 2 %igen Novocainlösung bis zur Marke 101 verdünnt, wodurch die Erythrocyten hämolysiert werden und die Thrombocyten eine Kugelform annehmen, in der sie nicht agglutinieren. Nach Umschütteln wird eine Zählkammer gefüllt, die 30 Min. in einer feuchten Kammer aufbewahrt wird. Durch Multiplikation der unter einem Phasenkontrastmikroskop in der gesamten Zählkammer ausgezählten Thrombocyten mit 2000 wird die Zahl der Thrombocyten in einem mm^3 Blut bzw. Plasma bestimmt.

5. ERYTHROCYTENZÄHLUNG

Die Erythrocytenzählung erfolgte wie üblich in der Zählkammer nach Thoma-Zeiss.

6. EINGESETZTE SUBSTANZEN

Die Konzentration aller den Ansätzen zugefügten Substanzen wird in Mol/Liter angegeben. Die Substanzen wurden in physiologischer NaCl-Lösung oder in isotonischem Phosphatpuffer von pH 7,3 gelöst und wenn erforderlich mit NaOH und HCl auf den geforderten pH-Wert eingestellt.
Histamin-Base
Histaminbiphosphat
Histamindihydrochlorid
Hydrazinsulfat
Marsilid (1-Isonicotinyl-2-isopropyl-hydrazin als Phosphat)
Niamid (1-2-Benzylcarbamyl-äthyl-2-isonicotinoyl-hydrazin)
Nikotin
Pyridylessigsäure
Serotonincreatininsulfat
Verbindung 48/80 (Kondensationsprodukt aus p-Methylphenyl-äthyl-methylamin mit Formaldehyd)
In sämtlichen Freisetzungsansätzen wurde Nikotin als Standardliberator verwendet, um seine Hi freisetzende Aktivität mit der anderer Liberatoren vergleichen zu können. Gegenüber dem Liberator 48/80 bot es den Vorteil, dass es auch bei höheren Konzentrationen keine Thrombocytenschädigung verursachte.

1. HI-FREISETZUNG AUS THROMBOCYTEN IN VITRO

a) Spontanfreisetzung

In den bei jedem Versuch mitgeführten Leeransätzen kann man eine Abnahme des Hi-Gehaltes der Thrombocyten beobachten. Diese, als Spontanfreisetzung bezeichnete Liberierung von Hi weist innerhalb 60 Min. einen Wert von $13 \pm 0,9$ % (ermittelter Durchschnittswert von 13 durchgeführten Bestimmungen) auf. Das Ausmass der Spontanfreisetzung ist abhängig von Temperatur, pH-Wert und Inkubationszeit.
Diese Spontanfreisetzung wurde bei der Berechnung der Ergebnisse jeweils abgezogen.

aa) Spontanfreisetzung und Temperatur

Thrombocytensuspensionen wurden 60 Min. lang bei 0, 18, 37, 40 und 45°C inkubiert. Die Freisetzung stieg zwischen 0 und 37°C leicht, zwischen 37 und 40°C stärker an. Bei 45°C war nur eine geringfügige Freisetzung zu beobachten.
Von Interesse für den Mechanismus der Entspeicherung ist der Befund, dass bei 0°C bereits eine Freisetzung feststellbar ist.

ab) Spontanfreisetzung und pH-Wert

Oberhalb pH 7 nimmt die Spontanfreisetzung proportional dem pH der Inkubationsflüssigkeit zu.

b) Hi-Freisetzung und Nikotinkonzentration

Tab. 1 zeigt den Einfluss verschiedener Nikotinkonzentrationen auf die Freisetzung von Hi aus in Plasma suspendierten Thrombocyten. Die Freisetzung steigt mit der Nikotinkonzentration an, wobei sie sich mit zunehmender Konzentration einem Maximalwert nähert.
Es war nicht möglich durch Nikotin eine 100 %ige Entspeicherung zu erlangen, da infolge der Basizität des Nikotin die Pufferkapazität des Plasmaeiweisses bzw. des isotonischen Phosphatpuffers überschritten wurde und in stark alkalischem Milieu die Spontanfreisetzung einen erheblichen Wert erreicht. Darüber hinaus ergab die mikroskopische Kontrolle, dass ein geringes Überschreiten des physiologischen pH-Bereiches eine Thrombocytenschädigung zur Folge hat.

TABELLE 1
Einfluss verschiedener Nikotinkonzentrationen auf die Freisetzung von Hi

Molare Nikotin-konzentration	Histamin freigesetzt	
	in μg/mg Protein	in % der theoretisch möglichen Menge
0,001	0,09	4
0,0025	0,25	10
0,003	0,50	20
0,004	0,70	28
0,005	0,62	25
0,0075	0,90	36
0,01	1,53	61
0,02	1,88	75

Wurden Thrombocyten vor der Entspeicherung mit Hi beladen, so wurde durch Nikotin eine Hi-Menge freigesetzt, die um 20 % höher lag als die Hi-Menge, die aus normalen Thrombocyten durch die gleiche Nikotinmenge freisetzbar war. Das lässt vermuten, dass das von der Aussenlösung in die Thrombocyten aufgenommene Hi eine lockere Bindung eingeht und daher durch Nikotin leicht freigesetzt werden kann.

c) Hi-Freisetzung und Wasserstoffionenkonzentration

Die pH-Abhängigkeit der Hi-Freisetzung durch eine 0,01 M Nikotinlösung stellt Tab.2 dar. Es wurde die Hi-Freisetzung im Bereich von pH 6,8 bis 7,9 bestimmt. Bei pH 6,8 erfolgt keine Freisetzung, diese beginnt oberhalb pH 7 und steigt mit zunehmender Alkalinität an. Bei der angegebenen Nikotinkonzentration und bei pH 7,65 werden ca. 50 % der maximal möglichen Hi-Menge liberiert.
Dieser Einfluss des pH-Wertes macht es notwendig, in allen Ansätzen einen konstanten Wert und zwar möglichst von pH 7,3 einzuhalten, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

TABELLE 2

Einfluss von verschiedenen pH-Werten auf die Hi-Freisetzung durch Nikotin 0,01 M

pH-Wert	Histamin freigesetzt in μg/mg Protein	Histamin freigesetzt in % der theoretisch möglichen Menge
6,8	0,15	6
6,9	0,18	7
7,0	0,25	9
7,2	0,55	20
7,4	0,91	33
7,6	1,25	46
7,9	2,35	86

d) Hi-Freisetzung und Inkubationstemperatur

Thrombocyten, 60 Min. in 0,01 M Nikotinlösung bei verschiedenen Temperaturen inkubiert, zeigen bis 37°C eine geringe Hi-Abgabe; oberhalb dieser Temperatur erfährt diese einen Anstieg, erreicht bei 41°C ihr Optimum und weist bei 45°C einen niedrigen Wert auf.

e) Hi-Freisetzung in N_2-Atmosphäre

Um die Frage einer eventuell bestehenden O_2-Abhängigkeit der Freisetzungsprozesse durch Nikotin zu untersuchen, wurden Inkubationen von Thrombocytensuspensionen in N_2-Atmosphäre durchgeführt. Gegenüber Vergleichsansätzen in Luft konnte kein Unterschied in der Hi-Freisetzung gefunden werden.
Bei der Bewertung dieser Ergebnisse ist in Betracht zu ziehen, dass der O_2-Vorrat der Thrombocyten während der Inkubationszeit ausreichend gross sein könnte, einen O_2-verbrauchenden, fermentativen Prozess zu unterhalten.
Auch UVNÄS (15) stellte fest, dass die Hi-Freisetzung O_2 unabhängig ist.

f) Hi-Freisetzung durch verschiedene Liberatoren

1. Die Verbindung 48/80

1951 wurde von FELDBERG und PATON (16) und 1952 von FELDBERG und SCHACHTER (17) mitgeteilt, dass die Verbindung 48/80 die Fähigkeit besitzt, Hi aus durchströmten Geweben freizusetzen. HÖGBERG und UVNÄS (13) vermuten, dass 48/80 ein an der Membran lokalisiertes lytisches Enzym aktiviert, wodurch die

Membranstruktur angegriffen und Hi freigesetzt wird. Tab.3 zeigt die Hi-Freisetzung durch 48/80 im Vergleich zu derjenigen durch Nikotin.

TABELLE 3
Hi-Freisetzung durch verschiedene 48/80 Konzentrationen im Vergleich zu derjenigen durch Nikotin

Molare 48/80 bzw. Nikotin Konzentration	Histamin freigesetzt			
	in µg/mg Protein		in % der theoretisch möglichen Menge	
	48/80	Nikotin	48/80	Nikotin
0,001	0,2	0,1	4	2
0,005	1,0	1,0	19	19
0,01	1,7	1,3	32	25
0,015	1,9	1,6	36	30
0,03	3,0		57	

In Ansätzen mit 48/80-Konzentrationen von über 0,03 M trat bereits eine Lysis der Thrombocyten auf, so dass eine 100 %ige Entspeicherung bei intakter Thrombocytenmembran auch bei Verwendung von 48/80 nicht erreicht werden konnte.

2. Lobelin

Bei Untersuchungen über die Ursache der pharmakologischen Ähnlichkeit zwischen den Alkaloiden Nikotin und Lobelin stellten SCHIEVELBEIN und WERLE (18) fest, dass Lobelin wie Nikotin in der Lage ist, 5-Hydroxytryptamin aus Thrombocyten freizusetzen und dass der Mechanismus der Freisetzung bei den Alkaloiden in wesentlichen Punkten der gleiche sein muss.
In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb auch untersucht, ob Lobelin befähigt ist, Hi aus Thrombocyten freizusetzen.
Aus Tab.4 geht hervor, dass Lobelin in äquimolaren Mengen eine grössere Hi freisetzende Wirksamkeit als Nikotin aufweist. Die Entspeicherung betrug in einem Ansatz mit einer 0,002 M Nikotin- und Lobelinkonzentration durch Nikotin 10 % und durch Lobelin 44 % der maximal möglichen Menge. Analog der Freisetzung durch Nikotin nimmt mit steigender Lobelinkonzentration die Hi-Freisetzung zu.

Molare Lobelin bzw. Nikotin Konzentration	Histamin freigesetzt in µg/mg Protein		Histamin freigesetzt in % der theoretisch möglichen Menge	
	Lobelin	Nikotin	Lobelin	Nikotin
0,001	0,30	0,10	12	4
0,003	2,15	0,41	76	15
0,005	2,62	0,67	97	25
0,010	2,70	1,64	100	61

3. Pyridylessigsäure

Pyridylessigsäure, ein im Organismus entstehendes Abbauprodukt des Nikotin, zeigt keine Hi freisetzende Wirkung.

4. 5-Hydroxytryptamin

Die Tatsache, dass für die Freisetzung von Hi aus Thrombocyten höhere Liberatorkonzentrationen nötig sind als für die von 5-Hydroxytryptamin, könnte dafür sprechen, dass ein Liberator auf dem Wege einer 5-Hydroxytryptamin-Entspeicherung die Hi-Freisetzung bewirkt.
DALY und WITKOP (19) weisen als Ausdruck einer Wechselwirkung zwischen den biogenen Aminen auf eine Freigabe von Hi durch 5-Hydroxytryptamin und Adrenalin hin. FELDBERG und SMITH (20) diskutieren die Möglichkeit einer Hi-Freisetzung durch Tryptamin und 5-Hydroxytryptamin.
In Thrombocytenansätzen, denen 5-Hydroxytryptamin in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt wurden, konnte jedoch eine Hi-Freisetzung durch 5-Hydroxytryptamin nicht beobachtet werden.

g) Hi-Freisetzung und Enzyminhibitoren

Nach GATGOUNIS und AYCOCK (21) wird die adrenalinfreisetzende Wirkung des Nikotin durch Isocarboxazid stark und durch Iproniazid und Niamid weniger stark blockiert. Von HAINING (22) wird beschrieben, dass der die anaphylaktische Reaktion begleitende Austritt von Hi aus Kaninchenblutkörperchen in das Plasma durch Na-salicylat und NaCl u.a. verhindert werden kann. HOLTZ und Mitarbeiter (23) weisen darauf hin, dass die Wirkung biogener Amine durch Iproniazid verstärkt werden kann, da es die Aminoxydase blockiert und so die Amine vor dem inaktivierenden Abbau schützt.
Diese Befunde deuten auf eine antagonistische Wirkung der angeführten Inhibitoren auf die Freisetzung biogener Amine hin, wobei der Angriffspunkt ihrer hemmenden Wirkung nicht bekannt ist.
In mehreren Versuchen wurde daher untersucht, ob einige Inhibitoren Einfluss auf die Freisetzung von Hi aus Thrombocyten haben.

1. Einfluss auf die Nikotinwirkung

a) Niamid

Nachdem in einem Vorversuch festgestellt worden war, dass Niamid allein keinen Einfluss auf den Hi-Gehalt der Thrombocyten besitzt, wurde untersucht, ob Niamid die Nikotinwirkung zu beeinflussen vermag. Bei konstant gehaltener Nikotinkonzentration und steigender Niamidkonzentration trat eine zunehmende Hemmung der Nikotinwirkung ein.
Da Niamid stark sauer reagiert und im physiologischen pH-Bereich nur schwer in Lösung gehalten werden kann, wurde in den folgenden Versuchen an Stelle des Niamid das besser lösliche Marsilid verwendet.

b) Marsilid

Tab.5 zeigt die Hemmung von steigenden Marsilidkonzentrationen bei konstanter Nikotinkonzentration. Lagen Marsilid und Nikotin in einem äquimolaren Verhätlnis vor, so betrug die Hemmung der Hi-freisetzenden Wirkung des Nikotin 89 %.

TABELLE 5
Einfluss steigender Marsilidkonzentrationen auf die Hi-freisetzende Wirkung des Nikotin.

Molare Konzentration		Histamingehalt	
Nikotin	Marsilid	in µg/mg Protein	in %
0	0	3,17	100
0,005	0	2,31	73
0,005	0,0025	2,83	88
0,005	0,0050	3,01	95
0,005	0,0075	2,82	88
0,005	0,0100	2,91	91

In analogen Versuchen wurden bei gleichbleibender Marsilidkonzentration verschiedene Nikotinmengen eingesetzt. Tab.6 stellt den Einfluss einer 0,006 M Marsilidkonzentration dar. Das Ausmass der Hemmung der Hi-Entspeicherung durch Nikotin hängt von dem Konzentrationsverhältnis zwischen Liberator und Inhibitor ab.

TABELLE 6

Einfluss steigender Nikotinkonzentrationen auf konstante Marsilidkonzentration

Molare Konzentration		Histamingehalt	
Marsilid	Nikotin	in µg/mg Protein	in %
0	0	2,9	100
0	0,003	2,2	75
0,006	0,003	2,9	100
0,006	0,005	2,6	89
0,006	0,006	2,5	86
0,006	0,008	2,5	86
0,006	0,012	1,9	66

c) Hydrazinsulfat

Hydrazinsulfat ist wie Niamid und Marsilid befähigt, die Nikotinwirkung zu vermindern, bzw. aufzuheben. Wurden plättchenreichem Plasma Nikotin und Hydrazinsulfat jeweils 0,01 M zugesetzt, so ergab sich eine Hemmung der Hi-Entspeicherung von 43 %, bei einem Verhältnis von Nikotin zu Hydrazinsulfat 1 : 4 ergab sich eine 100 %ige Nikotinhemmung.

2. Beeinflussung der 48/80-Wirkung

a) Marsilid

Wie aus Tab. 7 ersichtlich, unterliegt auch 48/80 dem hemmenden Einfluss dieses Enzyminhibitors. Marsilid, in äquimolarer Konzentration zu 48/80, verursacht eine 64 %ige Hemmung der Hi-Freisetzung aus Thrombocyten; im Verhältnis 2 : 1 eine 100 %ige Hemmung. Verschiedene 48/80 Konzentrationen bei konstanter Marsilidkonzentration ergaben mit steigender Konzentration eine zunehmende Aufhebung des hemmenden Einflusses von Marsilid.

TABELLE 7

Einfluss steigender Marsilidkonzentrationen auf die 48/80-Wirkung bei der Hi-Freisetzung

Molare Konzentration		Histamingehalt	
48/80	Marsilid	in µg/mg Protein	in %
0	0	1,95	100
0,0028	0	0,81	42
0,0028	0,0018	1,48	76
0,0028	0,0036	1,58	82
0,0028	0,0054	1,94	99
0,0028	0,0108	1,95	100

h) Einfluss des Plasmas auf die Hi-Freisetzung

Der von TIDBALL und SHORE (24) beobachtete Einfluss des Plasmas auf die Höhe der Hi-Freisetzung aus Thrombocyten konnte in einigen Versuchen bestätigt werden. In Plasma und in NaCl-citrat-Lösung suspendierte Thrombocyten, auf einen pH-Wert von 7,3 gebracht, wurden unter gleichen Bedingungen verschiedenen Nikotinmengen ausgesetzt. Die Hi-Bestimmung ergab, dass der Hi-Gehalt der in Plasma befindlichen Thrombocyten durch eine 0,005 M Nikotinlösung auf 68 % reduziert wurde, während er bei den in NaCl suspendierten Plättchen nur auf 90 % des ursprünglichen Wertes erniedrigt wurde. Ansätze anderer Nikotinkonzentrationen ergaben das gleiche Verhältnis der Hi-Abnahme zwischen in Plasma und in NaCl entspeicherten Thrombocyten. Plasma erhöht demnach die Hi-freisetzende Wirkung des Nikotin.

2. HI-FREISETZUNG IN VIVO

Die intravenöse Injektion von 48/80 und Hi bewirkt bei narkotisierten Hunden eine Blutdrucksenkung.
Wir prüften, ob die in vitro erreichte Unterdrückung der Hi-Freisetzung durch Niamid in vivo zu demonstrieren ist.
Da es nicht möglich ist, an einem Tier eine individuell wirksame 48/80-Menge zu bestimmen, da die Hi-Speicher schnell erschöpft sind, wurde an mehreren Tieren eine sicher wirksame Mindestdosis an Liberator ermittelt. Diese Dosis lag bei 100 ug 48/80/kg Körpergewicht und löste eine Blutdrucksenkung von 40-50 mm Hg aus.
Einem 8 kg schweren Hund wurden je 30 mg Niamid/kg Körpergewicht i.m. und i.v. injiziert. Der nach Injektion von Niamid auftretende geringe Blutdruckabfall kann nicht auf eine Hi-Freisetzung zurückgeführt werden, da er uncharakteristisch ist und weder demjenigen nach 48/80 noch demjenigen nach Hi gleicht. Nach etwa 5 Min. erfolgte die i.v. Injektion von 800 µg 48/80, die nur von einem sehr geringen Blutdruckabfall gefolgt war. Zur Überprüfung der Ansprechbarkeit des Hundes für exogenes Hi, auch nach Vorbehandlung mit Niamid, wurden 2 µg/kg Hi i.v. injiziert, worauf eine Blutdrucksenkung auftrat.
Inhibitoren der MO, wenigstens soweit sie Hydrazide sind, sind demnach auch in vivo befähigt, die Hi-Freisetzung zu unterdrücken.

3. HI-FREISETZUNG AUS DEM ISOLIERTEN DARM

Hi vermag den isolierten Meerschweinchendarm zur Kontraktion zu erregen. Auch 48/80 bewirkt durch Hi-Freisetzung (25) eine Kontraktion des Darmes.

Isolierte, in 20 ml Tyrodelösung nach MAGNUS suspendierte Dünndarmstücke wurden durch wiederholte Zugabe abnehmender Hi-Mengen zur Suspensionsflüssigkeit im Abstand von je 3 Min. in üblicher Weise für Hi empfindlich gemacht, bis das Darmstück auf 0,5 μg Hi mit einer konstanten Kontraktionshöhe ansprach. Es wurden dann 100 μg 48/80, in NaCl gelöst, in die Suspensionsflüssigkeit gegeben, welche nach kurzer Latenz eine deutliche Kontraktion verursachten.
Die anschliessende Zugabe von 1000 μg Niamid, gelöst in physiologischer NaCl-Lösung, rief keine Kontraktion des Darmes hervor. Nach Vorgabe von 1000 μg Niamid wurde durch Verabfolgung von 48/80 keine Kontraktion des Darmes ausgelöst. Zusatz von 0,5 μg Hi ohne vorhergehendes Spülen bewirkte eine gegenüber dem Ausgangswert verminderte Kontraktion. Nach dem Spülen kehrte die Ansprechbarkeit des Darmes gegenüber Hi und 48/80 in vollem Masse zurück. Letzteres ist darauf zurückzuführen, dass bei einmaliger Einbringung von 48/80 keine vollständige Entspeicherung des Hi stattgefunden hat.

Auf Grund dieses Befundes kann nicht geschlossen werden, dass Niamid die Hi-Freisetzung verhindert. Niamid vermag die Hi-Wirkung aufzuheben und zwar in Abhängigkeit von der Niamid- bzw. der Hi-Konzentration.

4. HI-AUFNAHME DURCH THROMBOCYTEN IN VITRO

a) Aufnahme von Hi durch normale Thrombocyten

Setzt man plättchenreichem Plasma Hi zu, so sind die Plättchen befähigt, gegen das Konzentrationsgefälle Hi bis zu einem Sättigungswert aufzunehmen. Wurden plättchenreichem Plasma steigende Mengen von Hi zugesetzt und bestimmte man den Hi-Gehalt der Plättchen nach 1 stündiger Inkubation bei 37°C, so ergaben sich die in Tab.8 aufgeführten Werte.

TABELLE 8
Aufnahme von Hi durch Thrombocyten

Histamin in ug/ml Ansatz	Histamingehalt in ug/mg Protein	in %
0	3,0	100
150	5,5	184
300	7,1	240
400	7,7	256
600	9,2	305
1000	10,7	358
3000	14,1	470

Für das Ausmass der Speicherung spielte es keine Rolle, in welcher Form -ob als freie Base, Biphosphat oder Dihydrochlorid- das Hi dem Plasma zugefügt wurde. Die Hi-Aufnahme durch die Thrombocyten, die in einem Konzentrationsbereich von 100-3000 µg Hi/ml thrombocytenreichem Plasma bestimmt wurden, stieg mit zunehmender Hi-Konzentration der Suspension und der Dauer der Inkubation an.

b) Aufnahme von Hi durch entspeicherte Thrombocyten

Thrombocyten, suspendiert in Plasma, wurden mit einer 0,02 M Nikotinlösung bis auf 25 % ihres ursprünglichen Hi-Gehaltes entspeichert. Nach zweimaligem Waschen der Thrombocyten in NaCl-citrat-Lösung wurden sie in isotonischem Phosphatpuffer von pH 7,3 suspendiert und 60 Min. mit 1000 µg Hi/ml Ansatz bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung des gespeicherten Hi ergab, dass diese Thrombocyten zwar wieder Hi aufnehmen, aber nur noch bis zu einem Wert, der 20 % über dem Normalgehalt an Hi lag. Die Ursache, dass der Hi-Gehalt nicht den gleichen oder einen höheren Wert erreichte wie bei unvorbehandelten Thrombocyten bei gleicher Hi-Konzentration in der Aussenlösung könnte in einer geringen Schädigung der Zellen liegen oder wahrscheinlich darin, dass während der Entspeicherung von den Thrombocyten aufgenommenes Nikotin durch den Waschprozess nicht völlig entfernt werden konnte und den nachfolgenden Speicherungsvorgang gehemmt hat.

c) Einfluss von Nikotin auf die Aufnahme von Hi

TABELLE 9
Einfluss steigender Nikotinkonzentrationen auf die Hi-Aufnahme durch Thrombocyten bei konstanter Hi-Konzentration

Histamin in µg/ml Ansatz	Molare Nikotinkonzentration	Histamingehalt in µg/mg Protein	in %
0	0	3,1	100
400	0	6,4	205
400	0,001	4,9	159
400	0,003	4,6	148
400	0,005	4,8	154
400	0,010	4,4	143
400	0,015	3,9	128

Tab. 9 zeigt die Wirkung von steigenden Nikotinkonzentrationen auf die Speicherung von Hi durch normale Plättchen bei konstanter Hi-Konzentration. Die im Ansatz ohne Nikotinzusatz erfolgte Erhöhung des Hi-Gehaltes um 100 % des Ausgangswertes durch 400 µg Hi/ml Ansatz, wurde durch eine 0,001 M Nikotinlösung auf 60 % herabgesetzt. Diese Hemmung der Hi-Aufnahme nimmt mit steigender Nikotinkonzentration zu.

d) Einfluss von 48/80 auf die Hi-Aufnahme

Wie Nikotin bewirkt 48/80, 48/80 ist dabei schon in geringeren Konzentrationen wirksam als Nikotin, eine Hemmung der Hi-Aufnahme durch Thrombocyten. Tab. 10 zeigt den Einfluss des Liberators 48/80 auf die Hi-Aufnahme.

TABELLE 10
Einfluss steigender 48/80-Konzentrationen auf die Hi-Aufnahme bei konstanter Hi-Konzentration in der Suspension

Histamin in µg/ml Ansatz	Molare 48/80-konzentration	Histamingehalt in ug/mg Protein	in %
0	0	3,4	100
400	0	6,1	179
400	0,000130	5,6	164
400	0,000325	5,3	156
400	0,000650	4,1	121
400	0,001300	4,0	118

e) Einfluss von Marsilid auf die Aufnahme von Hi

Wie in Freisetzungsversuchen gezeigt werden konnte, vermag Marsilid in bestimmten Konzentrationen die Hi-freisetzende Wirkung des Nikotin zu hemmen. Nach SCHIEVELBEIN (26) vermag Marsalid die Nikotinwirkung bei der Aufnahme von 5-Hydroxytryptamin zu verringern; es wurde daher untersucht, ob diese Wirkung sich auch bei der Hi-Aufnahme nachweisen lässt. Mit Thrombocytenansätzen, die jeweils 400 µg Hi/ml Lösung, konstante Marsilid- und steigende Nikotinkonzentrationen enthielten, wurde festgestellt, dass Marsilid auch in Konzentrationen bis 0,007 M die Hemmung der Hi-Aufnahme durch Nikotin nicht zu beeinflussen vermag.
Tab.11 zeigt die Aufnahme von Hi bei Zusatz von Nikotin und Marsilid und als Vergleichswert die Aufnahmehemmung durch Nikotin ohne Marsilid.

TABELLE 11
Einfluss von Marsilid auf die Nikotinwirkung bei der Speicherung von Hi

Histamin in µg/ml Ansatz	Molare Konzentration Marsilid	Molare Konzentration Nikotin	Histamingehalt in µg/mg Protein	Histamingehalt in %
0	0	0	3,4	100
400	0	0	6,1	179
400	0	0,0010	5,6	164
400	0,007	0,0010	5,4	160
400	0,007	0,0035	5,3	156
400	0,007	0,0050	4,9	144
400	0,007	0,0075	4,7	138
400	0,007	0,100	4,6	135
400	0,007	0,150	4,5	132

Analoge Ansätze, in denen an Stelle des Marsilid Hydrazinsulfat eingesetzt wurde, brachten gleiche Resultate, ebenso Versuche, in denen Nikotin durch 48/80 ersetzt wurde.

5. HI-VERTEILUNGSBILANZ IM KANINCHENBLUT

Nach SHORE et al (4) besitzt Kaninchenblut mit 1,8-4,9 µg/g den höchsten Hi-Gehalt von allen anderen untersuchten Organen. In 15 Bestimmungen des Hi-Gehaltes und der Thrombocytenzahl im Kaninchenblut wurden folgende Werte ermittelt:
Durchschnittsgehalt an Hi in 10 ml Ansatz von thrombocytenreichem Plasma:

7,6 µg Hi (Schwankungsbreite von 2,9-22,1 µg Hi).

	Thrombocytenzahl/ml
Vollblut	430×10^6
thrombocytenreiches Plasma	404×10^6

	Hi in µg berechnet auf jeweils 1 ml Vollblut
Vollblut	6,70
Plasma	3,50
Thrombocyten	0,81
Erythrocyten	1,62
Leukocyten	0,77

DISKUSSION

1. FUNKTION DER THROMBOCYTEN

Die funktionelle Bedeutung der Thrombocyten liegt vorwiegend auf dem Gebiet der Blutgerinnung, daneben scheint ihnen nach UDENFRIEND (9) eine Funktion bei der Aufnahme von im Blut befindlichen biogenen Aminen, z.B. von 5-Hydroxytryptamin zuzukommen. Dies trifft nach den von CODE (6) gemachten Feststellungen wohl auch für Hi zu, das, wenn es frei im Plasma kreist durch Speicherung rasch pharmakologisch inaktiviert wird. Nach Untersuchungen dieser Autoren sind Thrombocyten befähigt, zu ihrem normalen Gehalt zusätzlich Hi aufzunehmen und es zu binden. Nach HUMPHREY und JAQUES (8) besitzen die Blutplättchen von Kaninchen einen durchschnittlichen Hi-Gehalt von 3,5 µg $Hi/10^9$ Plättchen. Sie schliessen, dass das im Blut gefundene Hi fast ausschliesslich aus Blutplättchen stammt, da die Hi-Werte im Blut sehr klein sind, wenn bei Aufarbeitung des Blutes Schädigungen der Plättchen vermieden werden. Nach CODE (6) ist das Hi des Blutes in weit überwiegender Menge in den geformten Elementen des Blutes enthalten. Nach PATON (5) finden sich grosse Mengen von Hi in Kaninchenthrombocyten und polymorphkernigen Leukocyten, während die frei zirkulierende Hi-Menge im Plasma sehr klein ist.

In vorliegender Arbeit wurde in 15 Bestimmungen ein durchschnittlicher Hi-Gehalt der Kaninchenthrombocyten von 2,1 µg $Hi/10^9$ Plättchen ermittelt. Die Hi-Verteilung zwischen Plasma und Thrombocyten im Kaninchenblut ergab ein Verhältnis von 4 : 1.

2. AUFNAHME UND FREISETZUNG VON HI

Die in Abschnitt 4 der Ergebnisse dargestellten Versuche bestätigen, dass Thrombocyten sowohl in Plasma als auch in Phosphatpuffer suspendiert, Hi in Abhängigkeit von der Konzentration in der Inkubationsflüssigkeit und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bis zu einer Sättigungsgrenze speichern können. Die Fähigkeit der Thrombocyten, die aufgenommene Hi-Menge unter Einwirkung von Nikotin leicht abzugeben, spricht dafür, dass dieses exogene Hi keine feste Bindung innerhalb der Thrombocyten eingeht.

Als Bindungspartner des Hi, wahrscheinlich in cytoplasmatischen Granula, sind eine Reihe von Verbindungen in Betracht gezogen worden. Von WERLE und AMANN (27) wurde eine Bindung der Base Hi an die Säure Heparin nachgewiesen, SCHAUER und EDER (12) messen ATP eine Bedeutung bei der Hi-Bindung bei, nach HÖGBERG und Mitarbeitern (13) scheinen Phospholipoide und nach LINDAHL (28) Lecithin und Cephalin eine Rolle für die Bindung zu spielen; Gewebssäuren und Proteine werden ebenfalls angeführt.

Unabhängig davon, welche Bindungsart für Hi in Frage kommt, ist die Thrombocytenmembran bei den Speicherungs- und Entspeicherungsprozessen von Bedeutung, da sie für Hi durchgängig sein muss. Wie an Hand einiger Liberatoren, Nikotin als Standardliberator, Lobelin und 48/80 gezeigt werden konnte, kann aus Thrombocyten unter bestimmten Bedingungen Hi freigesetzt werden. Die Liberatoren Lobelin und 48/80 unterscheiden sich in ihrer Wirkung vom Nikotin nur durch die Grösse ihrer Hi-freisetzenden Aktivität. Die Hi-Freisetzung ist ein von der Konzentration des Liberators, der Inkubationstemperatur- und Dauer und dem pH-Wert abhängiger Vorgang. Der pH-Wert der Inkubationsflüssigkeit spielt sowohl bei der Hi-Freisetzung durch basische Liberatoren als auch bei der Spontanfreisetzung eine Rolle für das Ausmass der Hi-Entspeicherung. Diesem Befund können verschiedene Ursachen zugrunde liegen. 1. kann die Bindungsfähigkeit der Receptoren für Hi mit steigendem pH-Wert abnehmen, im Falle der Annahme, dass Hi eine Bindung mit Heparin eingeht, findet man für diese Möglichkeit eine Erklärung, da die Bindung von Hi an Heparin vom sauren zum alkalischen Bereich abnimmt (5). Für eine Bindung von Hi an das ATP-Molekül ist diese Erwägung nicht zutreffend. 2. Mit steigender Basizität nimmt die Aktivität des basischen Liberators zu. 3. Gegen die Vermutung, dass mit steigendem pH-Wert eine Schädigung der Membran und damit der Thrombocytenstruktur erfolgt, spricht, dass Thrombocyten nach Entspeicherung durch hohe Nikotinkonzentrationen noch in der Lage sind, Hi aufzunehmen, ein Vorgang, der eine intakte Struktur voraussetzt.

Für die Klärung des Angriffspunktes der Liberatoren bei der Hi-Freisetzung steht eine Reihe von Theorien zur Diskussion. Eine unter diesen, die Austauschtheo-

rie, basierend auf derVorstellung, dass jede Base höherer Affinität zur Hi-bindenden Gewebssäure dieses aus seiner Bindung verdrängt, konnte von FELDBERG und PATON (16) widerlegt werden, die feststellten, dass ein Molekül 48/80 10-100 Moleküle Hi freisetzt, ein Vorgang, der einen einfachen Austauschmechanismus ausschliesst. Die Beobachtung von FELDBERG, SMITH und BURKHALTER (29), dass die Hi-Freisetzung sekundär durch 5-Hydroxytryptamin erfolgt, das zuerst freigesetzt wird, konnte in Versuchen nicht bestätigt werden.

Es ist bekannt, dass der Mechanismus der Hi-Freisetzung in Beziehung zum Stoffwechsel der Thrombocyten steht, der unter Einwirkung von Liberatoren eine Störung erfährt. Ebenso ist bekannt, dass Nikotin Fermentsysteme, z.B. Cholinesterase und Cholinacetylase, beeinflusst. - Nach LÖHR und WALLER (30) nehmen zwei Enzyme und zwar die G-6-PDH und die Phosphoglyceraldehyddehydrogenase im Stoffwechsel der Thrombocyten, die einen erheblichen Eigenstoffwechsel besitzen, eine besondere Stellung ein. Ein Verlust an Aktivität dieser Enzyme, z.B. in Verlaufe der Zellalterung, führt zu einem Erliegen des Energiestoffwechsels. Würde unter Nikotinwirkung eine Schädigung des Thrombocytenstoffwechsels entstehen, erkennbar etwa am Aktivitätsverlust dieser Enzyme, so könnte sekundär eine Freisetzung von Hi erfolgen.

Eine Aktivitätsminderung der G-6-PDH unter Nikotineinfluss konnte jedoch nicht festgestellt werden (SCHIEVELBEIN). Ausserdem lässt der Befund, dass die Aufnahme von Hi nach Entspeicherung der Plättchen mit Nikotin in fast demselben Masse möglich ist wie bei normalen Thrombocyten, den Schluss zu, dass der Energiestoffwechsel der Plättchen nicht oder nur unwesentlich geschädigt ist; denn die Hi-Speicherung ist als aktiver Transport ein energieverbrauchender Prozess und die Energielieferung ist an einen intakten Stoffwechsel gebunden.

Nikotin kommt nicht nur die Fähigkeit zu, Hi aus Thrombocyten freizusetzen, sondern in Abhängigkeit von der Konzentration auch die Aufnahme des Hi zu hemmen. Nikotin ist nach seiner Einwirkung auf die Thrombocyten in diesen nachweisbar (SCHIEVELBEIN 1963). Es scheint, dass Nikotin einen Einfluss auf die Membranpermeabilität ausübt, in dessen Folge die Membran sowohl für Nikotin als auch für Hi im Sinne eines Austritts aus der Zelle permeabel wird.

Die Ansicht, dass die Membran Angriffspunkt der Liberatoren sei, wird von einigen Autoren geäussert, sei es, dass sie die Aktivierung eines an der Membran lokalisierten lytischen Enzyms, die Wirkung einer oberflächenaktiven Substanz oder eine Permeabilitätserhöhung der Membran annehmen. Nikotin, wahrscheinlich Liberatoren allgemein, müssen also, um Hi zu mobilisieren, den Zustand der Membran ändern, ohne dass dabei die Zellintegrität beeinträchtigt wird.

Für die Beurteilung der Liberierungsprozesse können Inhibitoren der MO, wie

Niamid, Iproniazid und Hydrazinsulfat herangezogen werden. Niamid verursacht nach Hi-Gabe einen verstärkten und prolongierten Blutdruckabfall gegenüber Hi-Verabfolgung ohne Niamidvorbehandlung. Nach Beobachtungen von HOLTZ und Mitarbeitern (23) kann die Wirkung biogener Amine durch Iproniazid verstärkt werden.

In der Literatur findet man Hinweise dafür, dass die Wirkung der Inhibitoren nicht allein auf MO-Blockierung, sondern auch auf Beeinflussung von Speicherungs- und Entspeicherungsvorgängen für biogene Amine beruht. So wird nach GATGOUNIS und AYCOCK (21) die Blutdruckwirkung des Nikotin, beruhend auf der Ausschüttung von Adrenalin aus den Nebennieren, durch Isocarboxazid stark, durch Iproniazid und Niamid weniger stark blockiert. DALY und WITKOP (19) stellen zur Diskussion, dass die Inhibitoren der MO den aktiven Transport eines Amins durch Blockierung eines wichtigen Enzyms hemmen könnten.

Da bisher nicht nachgewiesen wurde, dass Nikotin einen Einfluss auf ein energieliefferndes Enzymsystem nimmt, ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass Iproniazid als Antagonist der Nikotinwirkung ein solches Fermentsystem beeinflusst. Führt man die Nikotinwirkung auf eine Permeabilitätssteigerung der Membran zurück, so ergibt sich für die Inhibitoren die Möglichkeit einer dem Nikotin antagonistischen Membranwirkung. Nach diesen Überlegungen könnte den Inhibitoren der MO eine permeabilitätsverringernde, membranabdichtende Wirkung zukommen, die den Austritt des Hi durch die Membran verhindert bzw. reduziert. Nikotin und Iproniazid stehen in einer direkten Wechselwirkung zueinander, die Hemmung des Nikotins ist abhängig von der Konzentration des Nikotin und des Iproniazid.

Die Überprüfung der Inhibitoraktivität gegenüber dem Hi-Liberator 48/80 im Tierversuch, beurteilt an den charakteristischen Hi-Wirkungen am Kreislauf und am Darm, ergab, dass eine bestimmte Inhibitordosis die durch 48/80 bewirkte Hi-Freisetzung zu unterdrücken vermag. Auch in vivo kann als Grundwirkung der Inhibitoren eine Membranabdichtung angenommen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass Hi die Thrombocytenmembran dauernd in beiden Richtungen, also in Richtung influx und eflux, passiert, dass aber ein energetisch ermöglichtes Konzentrationsgefälle gegen die Suspensionsflüssigkeit, also das Plasma, aufrecht erhalten wird. Da Nikotin Hi-Freisetzung und Hemmung der Hi-Aufnahme bewirkt, resultiert eine Entspeicherung bis nahe an den Konzentrationsausgleich. Demgegenüber steht die Wirkung der Inhibitoren der MO, die den Prozess der Entspeicherung hemmen und damit die Aufnahme von Hi fördern.

3. VERGLEICH ZWISCHEN SPEICHERUNG UND FREISETZUNG VON HI UND 5-HYDROXYTRYPTAMIN

Vergleichende Untersuchungen über die Speicherung und Freisetzung von Hi und 5-Hydroxytryptamin (SCHIEVELBEIN) ergaben, dass der Mechanismus der Aufnahme und Freisetzung beider Amine in den wesentlichen Punkten der gleiche ist.

In Bezug auf Abhängigkeit der Freisetzung von Hi und 5-Hydroxytryptamin durch Nikotin von dem pH-Wert, der Inkubationstemperatur und Dauer ergaben sich keine Unterschiede, jedoch lagen die Nikotinkonzentrationen, die zu einer Hi-Freisetzung notwendig waren, höher als diejenigen, die für eine 5-Hydroxytryptamin-Freisetzung erforderlich waren.

Nikotin und die Verbindung 48/80 hemmen also die Speicherungsfähigkeit der Thrombocyten sowohl für 5-Hydroxytryptamin als auch für Hi.

Die Hemmsubstanzen der Nikotinwirkung auf die 5-Hydroxytryptamin-Freisetzung waren auch in Bezug auf die Hi-Freisetzung wirksam. Der von SCHIEVELBEIN (1962) angegebene hemmende Einfluss des Marsilid auf die Nikotinwirkung bei der Aufnahme von 5-Hydroxytryptamin war jedoch bei der Hi-Aufnahme nicht zu beobachten.

Die in vivo demonstrierte Freisetzung von 5-Hydroxytryptamin und die Hemmung dieses Vorganges durch den MO-Inhibitor Niamid war auch für Hi nachweisbar.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Nikotin vermag Histamin aus plättchenreichem Plasma und aus in isotonischem Phosphatpuffer suspendierten Thrombocyten freizusetzen. Die Freisetzung beruht wahrscheinlich auf einer Membranbeeinflussung im Sinne einer Hemmung der Hi-Aufnahme.
2. Die Hi-Freisetzung ist abhängig von der Nikotinkonzentration, dem pH-Wert und der Inkubationstemperatur in der Suspensionsflüssigkeit.
3. Die Abwesenheit von Sauerstoff, z.B. Belassen der Plättchen in N_2-Atmosphäre hat keinen Einfluss auf die Höhe der Hi-Freisetzung. Die Hi-Freisetzung scheint ein O_2 unabhängiger Vorgang zu sein.
4. Die basischen Liberatoren 48/80 und Lobelin setzen unter gleichen Bedingungen wie Nikotin Hi aus Thrombocyten in vitro frei. Pyridylessigsäure und 5-Hydroxytryptamin haben keine Hi-freisetzende Wirkung.
5. Niamid, Marsilid und Hydrazinsulfat vermögen in vitro die Hi-freisetzende Aktivität des Nikotin und 48/80 zu hemmen, wahrscheinlich durch eine membranabdichtende Wirkung, die eine Hemmung der Hi-Entspeicherung zur Folge hat.
6. Die Freisetzung und die Hemmung der Freisetzung von Hi durch Niamid kann am narkotisierten Hund und isolierten Meerschweinchendarm demonstriert werden.
7. Unveränderte und durch Nikotin entspeicherte Thrombocyten sind befähigt, Hi aufzunehmen und zu binden.
8. Nikotin und 48/80 vermögen die Aufnahme von Hi durch Thrombocyten in vitro zu hemmen.
9. Der hemmende Einfluss von Nikotin und 48/80 auf die Hi-Aufnahme konnte durch Iproniazid und Hydrazinsulfat nicht blockiert werden.
10. Die Bedeutung der gewonnenen Ergebnisse wird diskutiert.

1. Schievelbein, H., Werle, E. u. Jacoby, W.:
Naturwissenschaften 48, 602 (1961)

2. Dale, H., H. and Laidlaw, P.P.:
J. Physiolog. 41, 318 (1910)

3. Schayer, R.W.:
Proc. of the international Union of Physiological Sciences. XXII. International Congress Leiden 852 (1962)

4. Shore, P.A., Burkhalter, A. and Cohn V.H., jr.:
J. Pharmacol. exp. Therap. 127, 182 (1959)

5. Paton, W.D.M.:
Pharmacol. Rev. 9, 269 (1957)

6. Code, C.T.: J. Physiol. 90, 349 (1937)

7. Schievelbein, H., Werle, E.:
Psychopharmacologia 3, 35-43 (1962)

8. Humphrey, J.H. and Jaques, R.:
J. Physiol. 124, 305-310 (1954)

9. Udenfried, S., Weissbach, H. and Brodie, B.B.:
Methods of biochemical Analysis. Vol. VI, p. 95. New York and London 1958

10. Schayer, R.W. and Kobayshi, Y.:
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 92, 653 (1956)

11. Schauer, A. und Werle, E.:
Z. ges. exp. Med. 131, 100 (1959)

12. Schauer, A. und Eder, M.:
Klin. Wschr. 39, 76 (1961)

13. Högberg, B. und Uvnäs, B.:
Acta physiol. scand. 41, 435 (1957); 44, 157 (1958)

14. Shore, P.A., Burkhalter, A. and Cohn V.H., jr.:
J. Pharmacol. exp. Therap. 127, 182 (1959)

15. Uvnäs, B. and Inga-Lisa Thon:
Exp. Cell. Res. 23, 45-57 (1961)

16. Feldberg, W. and Paton, W.D.M.:
J. Physiol. 114, 490 (1951)

17. Feldberg, W. and Schachter, M.:
J. Physiol. 118, 124 (1952)

18. Schievelbein, H. und Werle, E.:
Deutsche med. Wschr. 87, 2023-2026 (1962)

19. Daly, J.W., Witkop, B.:
Angew. Chemie 75, 552 (1963)

20. Feldberg, W. and Smith, A.N.:
J. Physiol. 124, 219 (1954)

21. Gatgounis, J. and Avcock J.:
Fed. Proc. 20, 89 (1961)

22. Haining, C.G.:
Brit. J. Pharmacol. 11, 357-363 (1956)

23. Holtz, P., Balzer, H. und Westermann, E.:
Arch. exp. Path. u. Pharm. 231, 361 (1957)

24. Tidball, M.E. and Shore, P.A.:
Fed. Proc. 20, 257 (1961)

Amer. J. Physiol. 202, 265 (1962)

25. Amann, R. und Werle, E.:
Klin. Wschr. 34, 207 (1956)

26. Schievelbein, H.:
Arnzeimittelforschung 13, 916 (1963)

27. Werle, E. u. Amann, R.:
Klin. Wschr. 34, 624 (1956)

28. Lindahl, K.M.:
Acta physiol. scand. 35, 146-152 (1955)

29. Feldberg, W. and Smith, A.N.:
J. Physiol. 124, 219 (1954)

30. Löhr, G.W. und Waller, H.D.:
Klin. Wschr. 37, 16 (1959)

Waller, H.D., Löhr, G.W. und Tabatabai, M.:
Klin. Wschr. 35, 1022 (1957)

LEBENSLAUF

Am 25. September 1941 wurde ich, Bärbl Zitzelsberger, als Tochter des Dr. med. Josef Zitztelsberger und seiner Ehefrau Charlotte Zitzelsberger, geb. Herold, in Zeitz geboren. Von 1947-1955 besuchte ich die Volksschule, von 1955-1959 die Oberschule in Zeitz und legte dort 1959 die Reifeprüfung ab.
Vom Winter-Semester 1959 bis Sommer-Semester 1961 studierte ich Medizin an der Karl-Marx-Universität in Leipzig, vom Winter-Semester 1961 bis Sommer-Semester 1961 an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg und bestand dort 1961 die ärztliche Vorprüfung. Seit dem Winter-Semester 1963 studiere ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München Medizin.